

共轭亚麻酸的生理功能及制备方法研究进展

鲍雅婷¹, 赵瑶瑶², 郑洲¹, 缪锦来¹

(1. 自然资源部第一海洋研究所, 山东 青岛 266061; 2. 青岛大学基础医学院, 山东 青岛 266071)

摘要:旨在为共轭亚麻酸 (CLNA) 在功能食品、保健品和药品等领域的应用提供科学的理论参考, 综述了 CLNA 的生理功能和制备方法。CLNA 具有抗癌、调节脂质代谢、抗炎、抗氧化、抗糖尿病等多种生理功能, 在预防和治疗许多常见疾病中具有较大的研究潜力, 特别是糖尿病、肥胖症以及乳腺癌、结肠癌等常见癌症。物理提取法制备 CLNA 时提取率较低, 不适用于工业上大规模生产, 化学合成法制备 CLNA 因需要底物和催化剂, 后续纯化步骤烦琐, 生物合成法和基因工程法可得到较高含量的 CLNA, 具有良好的发展前景。

关键词:共轭亚麻酸; 生理功能; 制备方法; 保健品

中图分类号: TS201.4; O629

文献标识码: A

文章编号: 1003-7969(2024)03-0054-08

Research progress in physiological function and preparation method of conjugated linolenic acid

BAO Yating¹, ZHAO Yaoyao², ZHENG Zhou¹, MIAO Jinlai¹

(1. First Institute of Oceanography, Ministry of Natural Resource, Qingdao 266061, Shandong, China; 2. School of Basic Medicine, Qingdao University, Qingdao 266071, Shandong, China)

Abstract: In order to provide scientific theoretical reference for the application of conjugated linolenic acid (CLNA) in the fields of functional foods, health products and medicines, the physiological function and preparation method of CLNA were reviewed. CLNA has a variety of physiological functions such as anti-cancer, regulating lipid metabolism, anti-inflammatory, anti-oxidation, anti-diabetic and so on. CLNA has great potential in the prevention and treatment of many common diseases, especially diabetes, obesity, and common cancers such as breast cancer and colon cancer. The extraction rate of CLNA prepared by physical extraction method is low, and it is not suitable for large-scale production in industry. Due to the need of substrates and catalysts, the subsequent purification step of the preparation of CLNA by chemical synthesis method is cumbersome. The microbial method and genetic engineering method can obtain a higher content of CLNA, so it has a good prospect for development.

Key words: conjugated linolenic acid; physiological function; preparation method; health products

共轭亚麻酸 (CLNA) 是一类具有 3 个共轭双键的十八碳三烯酸^[1], 主要存在于桐树、石榴、苦瓜、葡萄等植物的种子中^[2-3]。目前研究较多的天然

植物来源的 CLNA 主要有 α -桐酸 (α -ESA)^[4]、 β -桐酸 (β -ESA)^[5]、锌树酸 (CPA)^[6]、 α -金盏花酸 (α -CDA)、 β -金盏花酸 (β -CDA)^[7]、石榴酸 (PA)^[8] 以及蓝花楹酸 (JA)^[9]。另外, 有些微生物也可以产生 CLNA, 常见微生物来源的 CLNA 有苜蓿米烯酸 (RLA)^[10] 和 *t*9, *t*11, *c*15-CLNA^[11]。几种 CLNA 的结构如表 1 所示。目前人们研究较多的两种 CLNA 为 α -ESA 和 PA。CLNA 的生理功能和制备方法是近年来研究的热点。研究发现, CLNA 具有抗癌、调节脂质代谢、抗炎、抗氧化、抗糖尿病等多

收稿日期: 2022-11-03; 修回日期: 2023-10-03

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2018YFD0901103); 国家自然科学基金 (42176242)

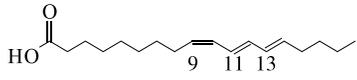
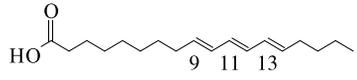
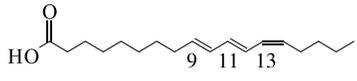
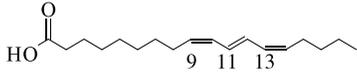
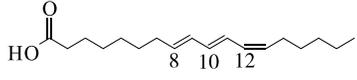
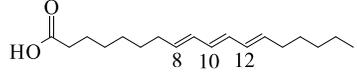
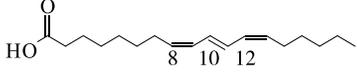
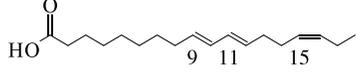
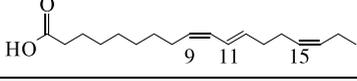
作者简介: 鲍雅婷 (1998), 女, 在读硕士, 研究方向为海洋生物活性物质 (E-mail) baoyt1998@163.com。

通信作者: 郑洲, 研究员, 硕士生导师 (E-mail) zhengzhou@fio.org.cn。

种生理功能,但 CLNA 的制备仍是目前研究的一大难题。本文对 CLNA 的生理功能及制备方法进行综

述,以期为后续 CLNA 的功能研究及应用开发提供理论参考。

表1 几种 CLNA 的结构

CLNA	分子式缩写	化学结构式
α -桐酸	c9,t11,t13-CLNA	
β -桐酸	t9,t11,t13-CLNA	
锌树酸	t9,t11,c13-CLNA	
石榴酸	c9,t11,c13-CLNA	
α -金盏花酸	t8,t10,c12-CLNA	
β -金盏花酸	t8,t10,t12-CLNA	
蓝花楹酸	c8,t10,c12-CLNA	
-	t9,t11,c15-CLNA	
菇米烯酸	c9,t11,c15-CLNA	

1 CLNA 的生理功能

1.1 抗癌作用

1.1.1 ESA 的抗癌作用

研究发现 α -ESA 具有较好的抗癌作用。 α -ESA 可以抑制人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 和 MDA-ER α 7 的增殖,40 μ mol/L 的 α -ESA 诱导这两种癌细胞凋亡的凋亡率达到 70%~90%,其机制可能是通过氧化依赖性诱导细胞凋亡阻断乳腺癌细胞增殖^[12]。Beatty 等^[13]研究发现,给小鼠口服富含天然 α -ESA 的桐油可以通过诱导铁死亡限制肿瘤的生长和转移。铁死亡是一种新型的细胞程序性死亡形式,与多不饱和酰基链氧化产生的脂质氢过氧化物有关,谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPX4)可减少脂质氢过氧化物,因而 GPX4 抑制剂可诱导铁死亡。虽然 α -ESA 不能直接改变 GPX4 活性,但在 GPX4 抑制剂中加入 α -ESA 缩短了铁死亡的时间,即 α -ESA 可增强 GPX4 抑制剂在多种细胞系中的毒性,且 α -ESA 通过并入细胞脂质中促进多种类型癌细胞的脂质过氧化和死亡。Ranasinghek 等^[14]研究发现,给肝癌模型大鼠饲喂含有 α -ESA 的苦籽油后,肝癌模型大鼠的肝发育不良得到改善,结节

的平均数量、直径和面积均显著减少,组织病理学肿瘤病变的大小也显著减小。研究发现, α -ESA 可以通过诱导酰基辅酶 A 氧化酶响应过氧化物酶体增殖物活化受体- γ (PPAR- γ)抑制小鼠肝癌细胞系 H4IIEC3 活性^[15]。 α -ESA 还可以通过抑制人类癌细胞系中的 Bcl-2 蛋白,增加 PPAR- γ 的表达并上调 p53 基因诱导细胞凋亡,从而预防结肠癌的发生^[16]。除此之外, α -ESA 对人类单核细胞白血病细胞也有较强的毒性,可能与脂质过氧化有关^[17]。另外,研究发现 β -ESA 对人膀胱癌细胞有强烈的细胞毒性,可诱导人膀胱癌 T24 细胞中活性氧(ROS)介导的细胞凋亡,可能与 PPAR- γ 活化有关,且 T24 细胞存活率随时间延长和 β -ESA 剂量的增加而降低^[5]。

1.1.2 PA 的抗癌作用

近年来,对 PA 抗癌功效的研究初见成果,PA 对单层或三维球体生长的 HCT-116 结肠癌细胞和 FaDu 下咽癌细胞具有高度的细胞毒性,这可能是 PA 通过触发铁死亡抑制两种癌细胞增殖所致^[8]。铁死亡为癌细胞的治疗提供了新的思路,包括肾细胞癌、黑色素瘤和胶质母细胞瘤在内的癌细

胞都很容易发生铁死亡^[13]。PA 通过 PI3K/AKT1/mTOR 信号通路抑制胶质母细胞瘤的增殖和转移,诱导 T98 胶质母细胞瘤细胞凋亡,因此在胶质母细胞瘤的治疗中,PA 与其他抗癌药物联合使用可能会提高治疗效果^[18]。PA 对前列腺癌的治疗也有一定帮助,目前使用 PA 和聚丙烯酰胺(PAM)合成了一种新型生物聚合物胶束(PAM-PA),用于携带前列腺癌治疗的化疗药物,PAM-PA 可作为有效载体,增强氟他胺对前列腺癌细胞的毒性作用^[19-20]。另外,PA 在低浓度下对人类单核细胞白血病细胞也有较强的细胞毒性^[17]。

1.1.3 CDA 的抗癌作用

Li 等^[7]研究发现, α -CDA 和 β -CDA 在体外可以通过激活氧化应激途径和 p38MAPK 信号通路诱导人绒毛膜癌 JEG-3 细胞凋亡并抑制其侵袭。p38MAPK 能够将细胞外信号转导至胞内,在多种细胞中参与胞内信号传递,调控细胞的生长分化、细胞周期和细胞凋亡等过程,实验发现 p38MAPK 抑制剂可以上调 Bcl-2/Bax 水平,抑制半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)和半胱氨酸蛋白酶-9(Caspase-9)的活化,阻断 α -CDA 和 β -CDA 诱导的细胞凋亡,这些结果表明, α -CDA 和 β -CDA 通过激活氧化应激途径和 p38MAPK 信号通路来诱导 JEG-3 细胞凋亡并抑制其侵袭,证明了 CDA 的抗癌作用和机制^[7]。

综上,CLNA 对白血病细胞及结肠癌、乳腺癌、前列腺癌以及肝癌等肿瘤细胞有抑制和预防作用,在抗癌药物和防癌保健品方面有广阔的应用前景,关于 CLNA 与癌症的研究仍在不断深入。

1.2 调节脂质代谢

1.2.1 调节血脂代谢

研究发现 CLNA 影响血脂代谢。Arao 等^[21]首次发现 PA 有降血脂作用,其以 PA 处理人肝癌 HepG2 细胞,发现细胞中载脂蛋白 B100(apoB100)的分泌和甘油三酯合成显著降低。推测 PA 可能是通过抑制人肝源性细胞中的甘油三酯合成从而减少 apoB100 的分泌,可以考虑将 PA 作为膳食中的降血脂成分。另外,该作者发现在肥胖 OLETF 大鼠饲料中添加富含 PA 的石榴籽油,可显著降低肥胖 OLETF 大鼠血浆甘油三酯中的单不饱和脂肪酸(MUFA)水平^[22]。研究发现 CPA 可以降低血浆甘油三酯浓度,饮食中添加 CPA 的小鼠血浆中甘油三酯浓度低于对照组,且 CPA 与过氧化物酶体增殖物活化受体- α (PPAR- α)有相似的降血脂作用^[6]。另外,JA 对小鼠血清参数也有影响,检测发现饲喂含 JA 油脂的小鼠其血液中低密度脂蛋白胆固醇水

平显著降低^[9]。Miranda 等^[23]研究发现,JA 在体内对总胆固醇含量影响较小,但可以显著降低非高密度脂蛋白胆固醇水平,促进了健康的血脂分布。

1.2.2 调节肝脏脂代谢

研究表明 CLNA 影响肝脏脂代谢。Arao 等^[22]研究了 PA 对肥胖 OLETF 大鼠脂质代谢的影响,结果发现,在肥胖 OLETF 大鼠的饲料中添加富含 PA 的石榴籽油可减小其肝脏中甘油三酯浓度,能够预防肝脏中甘油三酯的过量积累。MUFA 合成的一个关键酶是膜结合硬脂酰辅酶 A 去饱和酶(SCD),它在脂肪酸底物的 δ -9 位置插入一个顺式双键,而 PA 可以抑制体内 δ -9 的去饱和,因此在饮食中添加 PA 可以减少肝脏中甘油三酯合成。Bialek 等^[24]在鸡的饲料中添加葡萄籽油和石榴籽油,以大豆油为对照进行实验,结果只在石榴籽油组的肝脏样本中检测到了 PA,且其肝脏中的瘤胃酸($c9,t11$ -C18:2,RA)含量极显著高于其他两组($p < 0.0001$)。这证明 PA 能在鸡的机体内有效转化为 RA,有效改善禽肉的脂肪酸含量。此外,研究发现 α -ESA 可以增加酰基辅酶 A 氧化酶活性,通过增加细胞 $NAD^+/NADH$ 比值和激活 PPAR、AMPK 和 SIRT1 信号通路影响肝脏脂质代谢,显著降低肝癌细胞系 H4IIEC3 细胞内甘油三酯的浓度^[25-26]。Saha 等^[27]研究发现, α -ESA 还可以通过降低肝脏中 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶活性降低胆固醇合成。

1.2.3 抗肥胖

膳食中的脂肪酸通过调节肠道菌群组成影响人类健康,饱和脂肪酸、MUFA、多不饱和脂肪酸、CLNA 与肠道微生物共享免疫系统激活/抑制途径,调节肥胖^[28]。Machado 等^[29]利用体外模型评估了 PA 调节肥胖相关代谢的潜在能力,结果发现,PA 可以引起 3T3-L1 脂肪细胞 PPAR- α 和 PPAR- γ 基因上调,抑制肌肉和脂肪组织中的核转录因子(NF- κ B)激活和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)表达,并强烈激活 PPAR- γ ,增加其表达,抑制脂肪形成,与 Hontecillas 等^[30]的研究结果一致。Khabeer 等^[31]研究发现,含有 PA 的石榴籽提取物可抑制人脂肪间充质干细胞的脂肪生成,且能有效调节肥胖相关基因 mRNA 的表达,增加体内的瘦素水平,抑制前脂肪细胞向脂肪细胞的分化,为肥胖症治疗提供了新思路。另有研究发现,食用含有 PA 的鸡蛋,可以在不降低体质量的情况下减少腰围,因此 PA 极有可能具有减少腹部肥胖的功效^[32]。但 PA 的抗

肥胖作用存在着争议, Miranda 等^[33]发现饮食中补充 0.5% PA 不仅没有减少脂肪积累, 反而导致肝脏发育不全。 α -ESA 与抗肥胖作用相关, α -ESA 在 3T3-L1 细胞培养中通过上调 SIRT1 和 AMPK 信号通路, 同时下调 PPAR- γ , 可抑制脂肪形成^[34]。JA 可以抑制硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 1 (SCD-1) 活性, 同时降低 SCD-1 mRNA 的表达水平, 这可能与抑制肥胖相关^[35]。虽然目前的研究认为 CLNA 很可能是一种潜在的抗肥胖因子^[36], 在体内发挥调节胆固醇含量和脂质形成的重要作用, 但 CLNA 是否能作为减肥产品得到广泛应用仍需大量研究以确保其安全性和有效性。

1.3 抗氧化作用

CLNA 的化学结构决定了其具有抗氧化作用。Saha 等^[37]研究发现, α -ESA 和 PA 均可以使服用亚硝酸钠而导致的抗氧化酶活性降低的大鼠状态恢复到正常水平, 且 α -ESA 的抗氧化活性强于 PA, CLNA 还可以改善亚硝酸钠引起的肾脏氧化应激。同时其还发现, α -ESA 和 PA 能够缓解肝脏损伤引起的脂质过氧化, 改善氧化应激产生的 DNA 损伤^[38], 可显著降低链脲佐菌素 (STZ) 诱导的糖尿病大鼠氧化应激和脂质过氧化, 改善血浆铁还原抗氧化能力^[39]。Pamisetty 等^[40]用添加 PA 的小麦粉制作面包, 发现富含 PA 的面包抗氧化活性显著增强。Adu-Frimpong 等^[41]发现, PA 和甘油三酯结合制备的纳米脂质体, 在体内通过增加超氧化物歧化酶和谷胱甘肽水平, 降低丙二醛浓度, 从而显著降低氧化应激。

1.4 抗炎作用

研究发现 CLNA 具有抗炎作用。Anusree 等^[42]研究了 PA 的抗炎功效, 用 TNF- α 处理 3T3-L1 脂肪细胞诱导胰岛素抵抗 (IR), 同时孵育不同浓度的 PA。结果发现, TNF- α 处理增加了细胞因子信号转导抑制因子 3 (SOCS3)、蛋白酪氨酸磷酸酶 1B (PTP1B) 的 mRNA 表达, 降低了胰岛素受体底物 1 (IRS1) 的含量, 导致葡萄糖摄取减少。而 PA 在 IR 期间以剂量依赖性方式防止 c-jun 氨基末端激酶 (JNK) 的过度表达, 显著缓解了促炎细胞因子的上调, 证明了 PA 可有效改善 TNF- α 诱导的 IR。另外, PA 和三酰甘油制备的纳米脂质体制剂在体内可以通过抑制白细胞介素-6 (IL-6) 和 TNF- α 发挥抗炎作用^[42]。 α -ESA 也具有较好的抗炎活性, 无论在体内还是体外模型中, α -ESA 纳米制剂对超敏大鼠的促炎性反应都明显减轻^[43]。 α -ESA 对脊髓损伤引起的继发性神经炎症有治疗作用。

CDGSH 铁硫结构域 2 (CISD2) 参与介导抗炎反应, α -ESA 可以缓解脊髓损伤导致的 CISD2、PPAR- β 和 I κ B 的下调, 并上调小鼠脊髓中的胶质纤维酸性蛋白, 此外, α -ESA 可减轻脂多糖诱导的 CISD2 下调, 在脊髓损伤治疗中发挥抗炎功效^[44-45]。

1.5 抗糖尿病

糖尿病是世界上最流行的疾病之一, 引起世界各国科研人员的广泛关注。目前已有研究表明 CLNA 在糖尿病治疗方面能发挥一定作用, 如 PA 对 2 型糖尿病有一定的治疗作用, PA 通过减少炎症细胞因子、调节葡萄糖稳态和抗氧化特性发挥抗糖尿病的作用^[46-47]。PPAR- γ 激动剂用于治疗糖尿病及其并发症^[48], 研究发现, PA 和 α -ESA 结合可以强烈激活 PPAR- γ , 增加 PPAR- γ 基因表达, 起到改善糖尿病的作用^[30, 49]。

2 CLNA 的制备

2.1 物理提取法

CLNA 广泛存在于一些植物种子中, 因此其生产在很大程度上依赖于从植物种子中提取油脂^[50]。CLNA 的物理提取法主要有溶剂提取、超声辅助提取、微波辅助萃取、超临界流体萃取、酶辅助提取、绿色溶剂提取等^[51]。采用物理提取法得到的植物油中 CLNA 含量一般较低, 常采用分子蒸馏、冷冻重结晶等技术进行富集。余瑶盼等^[52]采用分子蒸馏技术对石榴籽油脂脂肪酸乙酯中的共轭亚麻酸乙酯进行富集, 在最佳工艺条件下, 共轭亚麻酸乙酯含量从蒸馏前的 80.68% 提升到了 95.23%。杨林等^[53]将桐油和石榴籽油皂化后用正己烷溶解, 通过冷冻重结晶法制备得到 CLNA, 其纯度达到了 99.6%。物理提取法操作相对简便, 且成本较低, 富集后提纯效果好, 适用于较大量高纯度 CLNA 的制备。但含有 CLNA 的植株由于其自身特性不适合大规模种植, 且植物种子中 CLNA 的含量有限, 因此物理提取法难以应用于工业上大规模制备 CLNA。

2.2 化学合成法

工业上生产 CLNA 一般采用化学合成法。化学合成 CLNA 的方法一般有 3 种, 即合成、脱水和碱异构化, 其中碱异构化是目前最常用的方法^[17]。碱异构化制备 CLNA 的原料为天然 α -亚麻酸 (α -LNA), 常用的催化剂为 KOH 和叔丁醇钾, 常用溶剂为乙二醇 (EG)、丙三醇^[54]。付若凝等^[55]优化了 CLNA 的碱异构化制备条件, 其以 EG 为反应溶剂, KOH 为催化剂, 在 α -LNA、KOH 与 EG 质量体积比 1:1.6:10、温度 160 $^{\circ}$ C、异构化时间 100 min 的条件下, CLNA 的含量可达 40.0%。采用尿素包合法富

集,在 m (CLNA 粗产物): m (尿素): V (95% 乙醇) 为 1:2.5:8 时,富集的 CLNA 含量为 74.3%。再经低温分步结晶处理后,CLNA 含量可达 90% 以上。碱异构化制备 CLNA 的操作简单,但可能存在收率低、有机试剂残留、催化剂难以去除等问题。

2.3 生物合成法

生物合成法制备 CLNA 优于化学合成法和物理提取法。研究发现,乳酸菌可以将 α -LNA 转化为 CLNA,且不同的乳酸菌发酵生产的 CLNA 种类和产量不同^[56]。植物乳酸杆菌 CCFM261 对 α -LNA 的转化率可达 56%,并且所产生的 CLNA 大部分以游离形式存在,利于分离纯化,但乳酸杆菌产生 CLNA 的机制尚不清楚^[11, 57]。除乳酸杆菌外,双歧杆菌属菌株也显示出了良好的生产 CLNA 的能力^[58]。Gorissen 等^[59]以亚油酸(LA)和 α -LNA 为原料采用双歧杆菌属菌株发酵生产 CLNA,其产物为 RLA 和 $i9$, $i11$, $c15$ -CLNA。Yang 等^[60]以 α -LNA 为原料,采用假链状双歧杆菌发酵生产 CLNA,可以将 86.91% 的游离 α -LNA 转化为 RLA,且 CLNA 异构体都在上清液中,利于分离纯化。Park 等^[61]以 α -LNA 为原料,采用短双歧杆菌 LMC520 在厌氧条件下发酵 6 h, α -LNA 转化成 RLA 的转化率达到 99%;继续优化实验条件,在 pH 2~7 厌氧条件下发酵 8 h 时,RLA 产量按比例增加近 6 倍,实验证明在优化的条件下,通过活性细菌转化可以产生特定的 CLNA 异构体。朱光贞等^[62]建立了分离乳酸菌发酵液中游离态 CLNA 异构体的方法,通过高效液相色谱法成功获得了结构单一的 CLNA 异构体。

2.4 基因工程法

转基因代谢工程可用于油料作物中生产 PA。研究发现,将编码石榴脂肪酸结合酶(PgFADX)和去饱和酶(PgFAD2)的 cDNA 在油用型油菜中共同表达,可使转基因甘蓝型油菜籽油中 PA 含量达到总脂肪酸含量的 11%^[63],这是迄今为止在代谢工程油料作物中报道的最高水平的 PA。有研究利用代谢工程在拟南芥籽油中生产 PA,选择最佳的异源启动子驱动 PgFADX cDNA 在拟南芥中表达,发现 linin 启动子的 PA 产率最高^[64]。Garaiova 等^[65]将编码 PA 的 cDNA 导入裂殖酵母细胞中,PgFADX 与 PgFAD2 的共同表达提高了 PA 含量。Wang 等^[66]也通过基因的联合表达增加了模型酵母菌中 PA 含量。油桐树种子富含 α -ESA,通过基因组学和转录组学数据分析 α -ESA 在桐树中富集的表达模式,可为设计含有高水平 α -ESA 的工程油

料奠定基础,同时为 α -ESA 生产提供新的思路^[67]。

3 结束语

CLNA 的多种生理功能与人们的健康密切相关,引起了越来越多的关注。虽然目前已经有一些有关 CLNA 的研究成果,但关于 CLNA 异构体的有效性数据依然较少,其作用机制和生理功能仍需进一步研究。自然界中存在的天然 CLNA 以及微生物中的 CLNA 异构体种类较多,目前研究集中在 PA 和 α -ESA 两种异构体,对于 CLNA 其他异构体的特殊生理功能及其机制仍需要继续探索。CLNA 可以通过物理提取法、化学合成法和生物合成法制得,但物理提取法和化学合成法存在收率低的问题,生物合成法制备 CLNA 也不够成熟,仍需不断优化制备方法提高 CLNA 的收率和安全性,同时通过基因工程、转录组学等生物学技术不断发掘更安全有效的生物学制备方式,以获得高纯度的 CLNA。

参考文献:

- [1] DHAR DUBEY K K, SHARMA G, KUMAR A. Conjugated linolenic acids: Implication in cancer[J]. J Agric Food Chem, 2019, 67(22): 6091-6101.
- [2] 傅伟昌,陈尚卫,顾小红,等. 葡萄籽油的脂肪酸分布分析及共轭亚麻酸的鉴定[J]. 中国油脂, 2009, 34(5): 75-79.
- [3] WANG D H, WANG Z, LE K P, et al. Potentially high value conjugated linolenic acids (CLnA) in melon seed waste[J]. J Agric Food Chem, 2019, 67(37): 10306-10312.
- [4] ALAOUIM E, SOULÈRE L, NOIRIEL A, et al. A continuous and sensitive spectrophotometric assay for lipase and phospholipase A activities using α -eleostearic acid-containing substrates[J]. Methods Mol Biol, 2018, 1835: 119-128.
- [5] SUN Z, WANG H, YE S, et al. Beta-eleostearic acid induce apoptosis in T24 human bladder cancer cells through reactive oxygen species (ROS)-mediated pathway[J]. Prostag Oth Lipid M, 2012, 99(1/2): 1-8.
- [6] HONTECILLAS R, DIGUARDO M, DURAN E, et al. Catalpic acid decreases abdominal fat deposition, improves glucose homeostasis and upregulates PPAR α expression in adipose tissue[J]. Clin Nutr, 2008, 27(5): 764-772.
- [7] LI Q, WANG H, YE S, et al. Induction of apoptosis and inhibition of invasion in choriocarcinoma JEG-3 cells by α -calendic acid and β -calendic acid[J]. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2013, 89(5): 367-376.
- [8] VERMONDEN P, VANCOPPENOLLE M, DIERGE E, et al. Punicic acid triggers ferroptotic cell death in carcinoma

- cells[J/OL]. *Nutrients*, 2021, 13(8): 2751[2022-11-03]. <https://doi.org/10.3390/nu13082751>.
- [9] VAN NIEUWENHOVE C P, DEL HUERTO MOYANO A, VAN NIEUWENHOVE G A, et al. *Jacaranda* oil administration improves serum biomarkers and bioavailability of bioactive conjugated fatty acids, and alters fatty acid profile of mice tissues[J]. *Lipids*, 2022, 57(1): 33-44.
- [10] FONTES A L, PIMENTEL L L, SIMÕES C D, et al. Evidences and perspectives in the utilization of CLNA isomers as bioactive compounds in foods[J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2017, 57(12): 2611-2622.
- [11] YANG B, CHEN H, GAO H, et al. Genetic determinates for conjugated linolenic acid production in *Lactobacillus plantarum* ZS2058[J]. *J Appl Microbiol*, 2020, 128(1): 191-201.
- [12] GROSSMANN M E, MIZUNO N K, DAMMEN M L, et al. Eleostearic acid inhibits breast cancer proliferation by means of an oxidation-dependent mechanism[J]. *Cancer Prev Res*, 2009, 2(10): 879-886.
- [13] BEATTY A, SINGH T, TYURINA Y Y, et al. Ferroptotic cell death triggered by conjugated linolenic acids is mediated by ACSL1[J/OL]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 2244[2022-11-03]. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22471-y>.
- [14] RANASINGHEK N K, PREMARATHNA A D, MAHAKAPUGE T A N, et al. *In vivo* anticancer effects of *Momordica charantia* seed fat on hepatocellular carcinoma in a rat model[J]. *J Ayurveda Integr Med*, 2021, 12(3): 435-442.
- [15] CHUANG C Y, HSU C, CHAO C Y, et al. Fractionation and identification of 9c, 11t, 13t-conjugated linolenic acid as an activator of PPAR α in bitter melon (*Momordica charantia* L.)[J]. *J Biomed Sci*, 2006, 13(6): 763-772.
- [16] TANAKA T, HOSOKAWA M, YASUI Y, et al. Cancer chemopreventive ability of conjugated linolenic acids[J]. *Int J Mol Sci*, 2011, 12(11): 7495-7509.
- [17] SUZUKI R, NOGUCHI R, OTA T, et al. Cytotoxic effect of conjugated trienoic fatty acids on mouse tumor and human monocytic leukemia cells[J]. *Lipids*, 2001, 36(5): 477-482.
- [18] METE M, ÜNSAL Ü Ü, AYDEMİR I, et al. Punicic acid inhibits glioblastoma migration and proliferation via the PI3K/AKT1/mTOR signaling pathway[J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2019, 19(9): 1120-1131.
- [19] MIRSAFAEI R, VARSHOSAZ J. Polyacrylamide-punicic acid conjugate-based micelles for flutamide delivery in PC3 cells of prostate cancer: Synthesis, characterisation and cytotoxicity studies[J]. *IET Nanobiotechnol*, 2020, 14(5): 417-422.
- [20] MIRSAFAEI R, VARSHOSAZ J, MIRSAFAEI S N. Folate-targeted polyacrylamide/punicic acid nanomicelles for flutamide delivery in prostate cancer: Characterization, in vitro biological evaluation, and its DFT study[J]. *Recent Pat Nanotechnol*, 2020, 14(4): 360-374.
- [21] ARAO K, YOTSUMOTO H, HAN S Y, et al. The 9cis, 11trans, 13cis isomer of conjugated linolenic acid reduces apolipoprotein B100 secretion and triacylglycerol synthesis in HepG2 cells[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2004, 68(12): 2643-2645.
- [22] ARAO K, WANG Y M, INOUE N, et al. Dietary effect of pomegranate seed oil rich in 9cis, 11trans, 13cis conjugated linolenic acid on lipid metabolism in obese, hyperlipidemic OLETF rats[J/OL]. *Lipids Health Dis*, 2004, 3: 24[2022-11-03]. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-3-24>.
- [23] MIRANDA J, FERNÁNDEZ-QUINTELA A, MACARULLA M T, et al. A comparison between CLNA and CLA effects on body fat, serum parameters and liver composition[J]. *J Physiol Biochem*, 2009, 65(1): 25-32.
- [24] BIALEK A, CZERWONKA M, BIALEK M, et al. Influence of pomegranate seed oil and grape seed oil on cholesterol content and fatty acids profile in livers of chickens[J]. *Acta Pol Pharm*, 2017, 74(2): 624-632.
- [25] CHEN G C, SU H M, LIN Y S, et al. A conjugated fatty acid present at high levels in bitter melon seed favorably affects lipid metabolism in hepatocytes by increasing NAD(+)/NADH ratio and activating PPAR α , AMPK and SIRT1 signaling pathway[J]. *J Nutr Biochem*, 2016, 33: 28-35.
- [26] CHANG Y Y, SU H M, CHEN S H, et al. Roles of peroxisome proliferator-activated receptor α in bitter melon seed oil-corrected lipid disorders and conversion of α -eleostearic acid into rumenic acid in C57BL/6J mice[J/OL]. *Nutrients*, 2016, 8(12): 805[2022-11-03]. <https://doi.org/10.3390/nu8120805>.
- [27] SAHA S S, CHAKRABORTY A, GHOSH S, et al. Comparative study of hypocholesterolemic and hypolipidemic effects of conjugated linolenic acid isomers against induced biochemical perturbations and aberration in erythrocyte membrane fluidity[J]. *Eur J Nutr*, 2012, 51(4): 483-495.
- [28] CÂNDIDO F G, VALENTE F X, GRZEŚKOWIAK Ł M, et al. Impact of dietary fat on gut microbiota and low-grade systemic inflammation: Mechanisms and clinical implications on obesity[J]. *Int J Food Sci Nutr*, 2018,

- 69(2): 125 – 143.
- [29] MACHADO M, COSTA E M, SILVA S, et al. Pomegranate oil's potential as an anti – obesity ingredient [J/OL]. *Molecules*, 2022, 27(15): 4958[2022 – 11 – 03]. <https://doi.org/10.3390/molecules27154958>.
- [30] HONTECILLAS R, O'SHEA M, EINERHAND A, et al. Activation of PPAR gamma and alpha by puniolic acid ameliorates glucose tolerance and suppresses obesity – related inflammation[J]. *J Am Coll Nutr*, 2009, 28(2): 184 – 195.
- [31] KHABEER T S, PRASHANT A, KRISHNAN H M. Dietary fatty acids from pomegranate seeds (*Punica granatum*) inhibit adipogenesis and impact the expression of the obesity – associated mRNA transcripts in human adipose – derived mesenchymal stem cells[J/OL]. *J Food Biochem*, 2019, 43(3): e12739 [2022 – 11 – 03]. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12739>.
- [32] NGO NJEMBE M T, PACHIKIAN B, LOBYSHEVA I, et al. A three – month consumption of eggs enriched with ω – 3, ω – 5 and ω – 7 polyunsaturated fatty acids significantly decreases the waist circumference of subjects at risk of developing metabolic syndrome: A double – blind randomized controlled trial[J/OL]. *Nutrients*, 2021, 13(2): 663 [2022 – 11 – 03]. <https://doi.org/10.3390/nu13020663>.
- [33] MIRANDA J, AGUIRRE L, FERNÁNDEZ – QUINTELA A, et al. Effects of pomegranate seed oil on glucose and lipid metabolism – related organs in rats fed an obesogenic diet[J]. *J Agric Food Chem*, 2013, 61(21): 5089 – 5096.
- [34] CHEN G C, CHEN W H, TSENG K T, et al. The anti – adiposity effect of bitter melon seed oil is solely attributed to its fatty acid components[J/OL]. *Lipids Health Dis*, 2017, 16(1): 186[2022 – 11 – 03]. <https://doi.org/10.1186/s12944-017-0578-3>.
- [35] SHINOHARA N, ITO J, TSUDUKI T, et al. Jacaric acid, a linolenic acid isomer with a conjugated triene system, reduces stearoyl – CoA desaturase expression in liver of mice[J]. *J Oleo Sci*, 2012, 61(8): 433 – 441.
- [36] MIRANDA J, ARIAS N, FERNÁNDEZ – QUINTELA A, et al. ¿Son los isómeros del ácido linolénico conjugado una alternativa a isómeros del ácido linoleico conjugado en la prevención de la obesidad? [J]. *Endocrinol Y Nutr*, 2014, 61(4): 209 – 219.
- [37] SAHA S S, GHOSH M. Protective effect of conjugated linolenic acid isomers present in vegetable oils against arsenite – induced renal toxicity in rat model [J]. *Nutrition*, 2013, 29(6): 903 – 910.
- [38] SAHA S S, GHOSH M. Ameliorative role of conjugated linolenic acid isomers against oxidative DNA damage induced by sodium arsenite in rat model[J]. *Food Chem Toxicol*, 2010, 48(12): 3398 – 3405.
- [39] SAHA S S, GHOSH M. Antioxidant and anti – inflammatory effect of conjugated linolenic acid isomers against streptozotocin – induced diabetes[J]. *Br J Nutr*, 2012, 108(6): 974 – 983.
- [40] PAMISETTY A, KUMAR K A, INDRANI D, et al. Rheological, physico – sensory and antioxidant properties of puniolic acid rich wheat bread[J]. *J Food Sci Technol*, 2020, 57(1): 253 – 262.
- [41] ADU – FRIMPONG M, FIREMPONG K, OMARI – SIAW E, et al. Preparation, optimization, and pharmacokinetic study of nanoliposomes loaded with triacylglycerol – bound puniolic acid for increased antihepatotoxic activity [J]. *Drug Dev Res*, 2019, 80(2): 230 – 245.
- [42] ANUSREE S S, SINDHU G, PREETHA RANI M R, et al. Insulin resistance in 3T3 – L1 adipocytes by TNF – α is improved by puniolic acid through upregulation of insulin signalling pathway and endocrine function, and downregulation of proinflammatory cytokines [J]. *Biochimie*, 2018, 146: 79 – 86.
- [43] PAUL D, MANNA K, SENGUPTA A, et al. A novel nanoformulation of α – eleostearic acid restores molecular pathogenesis of hypersensitivity [J]. *Nanomed – Nanotechnol Biol Med*, 2019, 14(5): 529 – 552.
- [44] KUNG W M, LIN C C, KUO C Y, et al. Wild bitter melon exerts anti – inflammatory effects by upregulating injury – attenuated CISD2 expression following spinal cord injury [J/OL]. *Behav Neurol*, 2020, 2020: 1080521 [2022 – 11 – 03]. <https://doi.org/10.1155/2020/1080521>.
- [45] KUNGW M, LIN M S. Beneficial impacts of *alpha* – eleostearic acid from wild bitter melon and curcumin on promotion of CDGSH iron – sulfur domain 2: Therapeutic roles in CNS injuries and diseases[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(7): 3289[2022 – 11 – 03]. <https://doi.org/10.3390/ijms22073289>.
- [46] KHAJEBISHAK Y, PAYAHOO L, ALIVAND M, et al. Puniolic acid: A potential compound of pomegranate seed oil in type 2 diabetes mellitus management [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(3): 2112 – 2120.
- [47] OLVERA – SANDOVAL C, FABELA – ILLESCAS H E, FERNÁNDEZ – MARTÍNEZ E, et al. Potential mechanisms of the improvement of glucose homeostasis in type 2 diabetes by pomegranate juice[J/OL]. *Antioxidants (Basel)*, 2022, 11(3): 553[2022 – 11 – 03]. <https://doi.org/10.3390/antiox11030553>.

- [48] LI Y, QI Y, HUANG T H, et al. Pomegranate flower: A unique traditional antidiabetic medicine with dual PPAR - α / - γ activator properties [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2008, 10(1): 10 - 17.
- [49] HUANG T H, PENG G, KOTA B P, et al. Anti - diabetic action of *Punica granatum* flower extract: Activation of PPAR - γ and identification of an active component [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2005, 207(2): 160 - 169.
- [50] HOLIC R, XU Y, CALDO K M P, et al. Bioactivity and biotechnological production of punicic acid [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102(8): 3537 - 3549.
- [51] GONG M, HU Y, WEI W, et al. Production of conjugated fattyacids: A review of recent advances[J/OL]. *Biotechnol Adv*, 2019, 37(8): 107454[2022 - 11 - 03]. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107454>.
- [52] 余瑶盼, 赵晨伟, 唐年初. 分子蒸馏富集石榴籽油脂肪酸乙酯中共轭亚麻酸乙酯的研究[J]. *中国油脂*, 2018, 43(1): 4 - 7.
- [53] 杨林, 曹莹, 杨小丽, 等. 共轭亚麻酸的制备与表征 [C]//中国化学会, 国家自然科学基金委员会. 中国化学会第四届有机化学学术会议论文集(下册). 上海: 《有机化学》编辑部, 2005.
- [54] 马红超, 张锐, 初婷婷, 等. 亚麻油的碱催化异构化 [J]. *大连工业大学学报*, 2011, 30(6): 426 - 428.
- [55] 付若凝, 徐坤华, 樊晔, 等. 碱异构化亚麻酸合成共轭亚麻酸[J]. *中国洗涤用品工业*, 2022(4): 28 - 33.
- [56] 杨波, 陈海琴, 刘李至, 等. 生物转化共轭亚麻酸乳酸菌的快速筛选 [J]. *中国油脂*, 2016, 41(10): 44 - 47.
- [57] 杨芹, 杨波, 刘李至, 等. 生物转化共轭亚麻酸植物乳杆菌的筛选及特性研究[J]. *食品与发酵工业*, 2016, 42(10): 34 - 38.
- [58] SALSINHA A S, PIMENTEL L L, FONTES A L, et al. Microbial production of conjugated linoleic acid and conjugated linolenic acid relies on a multienzymatic system [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2018, 82(4): e00018 - e00019.
- [59] GORISSEN L, VUYST L D, RAES K, et al. Conjugated linoleic and linolenic acid production kinetics by *Bifidobacteria* differ among strains [J]. *Int J Food Microbiol*, 2012, 155(3): 234 - 240.
- [60] YANG B, CHEN H, STANTON C, et al. Mining *Bifidobacteria* from the neonatal gastrointestinal tract for conjugated linolenic acid production [J]. *Bioengineered*, 2017, 8(3): 232 - 238.
- [61] PARK H G, CHO H T, SONG M C, et al. Production of a conjugated fatty acid by *Bifidobacterium breve* LMC520 from α - linolenic acid: Conjugated linolenic acid (CLnA) [J]. *J Agric Food Chem*, 2012, 60(12): 3204 - 3210.
- [62] 朱光贞, 杨波, 杨芹, 等. 乳酸菌源共轭亚麻酸的分离制备[J]. *中国油脂*, 2019, 44(1): 86 - 91, 109.
- [63] XU Y, MIETKIEWSKA E, SHAH S, et al. Punicic acid production in *Brassica napus* [J]. *Metab Eng*, 2020, 62: 20 - 29.
- [64] SONG Z, MIETKIEWSKA E, WESELAKE R J. The linin promoter is highly effective in enhancing punicic acid production in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell Rep*, 2017, 36(3): 447 - 457.
- [65] GARAIOVA M, MIETKIEWSKA E, WESELAKE R J, et al. Metabolic engineering of *Schizosaccharomyces pombe* to produce punicic acid, a conjugated fatty acid with nutraceutical properties [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2017, 101(21): 7913 - 7922.
- [66] WANG J, XU Y, HOLIC R, et al. Improving the production of punicic acid in baker's yeast by engineering genes in acyl channeling processes and adjusting precursor supply [J]. *J Agric Food Chem*, 2021, 69(33): 9616 - 9624.
- [67] CUI P, LIN Q, FANG D, et al. Tung tree (*Vernicia fordii*, Hemsl.) genome and transcriptome sequencing reveals co - ordinate up - regulation of fatty acid β - oxidation and triacylglycerol biosynthesis pathways during eleostearic acid accumulation in seeds [J]. *Plant Cell Physiol*, 2018, 59(10): 1990 - 2003.